

Genscreen™ HIV-1 Ag EIA

192 Tests

71120

**TEST IMMUNOENZYMATIQUE (EIA) POUR LA DÉTECTION
DE L'ANTIGÈNE P24 DU VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE ACQUISE
HUMAINE DE TYPE 1 (VIH-1) DANS LE SÉRUM, LE PLASMA HUMAIN
ET LES SURNAGEANTS DE CULTURE CELLULAIRE**

IVD

Contrôle de qualité du fabricant

Tous les produits fabriqués et commercialisés par la société Bio-Rad sont placés sous un système d'assurance qualité de la réception des matières premières jusqu'à la commercialisation des produits finis.

Chaque lot du produit fini fait l'objet d'un contrôle de qualité et n'est commercialisé que s'il est conforme aux critères d'acceptation.

La documentation relative à la production et au contrôle de chaque lot est conservée par notre société.

TABLE DES MATIÈRES

- 1 - INTÉRÊT CLINIQUE
- 2 - PRINCIPE DE LA TROUSSE Genscreen™ HIV-1 ANTIGEN EIA
- 3 - COMPOSITION DE LA TROUSSE Genscreen™ HIV-1 ANTIGEN EIA
- 4 - MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI
- 5 - CONSIGNES D'HYGIÈNE ET DE SÉCURITÉ
- 6 - PRÉCAUTIONS
- 7 - ÉCHANTILLONS
- 8 - RECONSTITUTION DES RÉACTIFS
- 9 - VALIDITÉ – CONSERVATION
- 10 - MODE OPÉRATOIRE
- 11 - CALCUL ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS
- 12 - VÉRIFICATION SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DU DÉPÔT DES ÉCHANTILLONS ET DES RÉACTIFS
- 13 - PERFORMANCES
- 14 - LIMITES DU TEST
- 15 - RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1 - INTÉRÊT CLINIQUE

L'agent étiologique du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) est un rétrovirus que l'on a nommé Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH). Le VIH a été isolé chez des patients atteints du SIDA et chez des individus sains faisant partie d'une population à risque pour le SIDA^{1, 2}. On sait que la transmission se fait par voie sexuelle, par l'utilisation d'aiguilles contaminées, par transfusion de produits sanguins contaminés, et de la mère infectée au fœtus ou au nouveau-né par voie placentaire^{1, 8}.

Il est normalement possible de détecter, dans le sang ou le plasma d'un individu ayant été exposé au virus, des anticorps spécifiques du virus, confirmant ainsi l'exposition. Dans la phase qui précède l'apparition d'anticorps détectables, des antigènes viraux libres sont déjà en circulation dans le sang. L'un de ces antigènes viraux est l'antigène p24, qui correspond à la principale protéine de la nucléocapside.

Les tests de dépistage de l'antigène du VIH peuvent être utilisés pour détecter la présence d'antigènes viraux et donc pour diagnostiquer une infection par le VIH, et ce avant que la séroconversion n'ait lieu.

La période d'antigénémie, qui précède l'apparition des anticorps anti-VIH, est variable et peut durer de quelques jours à quelques semaines chez les individus infectés. Lors de la séroconversion, les anticorps spécifiques du virus forment des complexes immuns avec les antigènes circulants, avec pour conséquence une forte chute du taux d'antigènes libres dans le sang et éventuellement la disparition complète de ces antigènes^{9, 11}. L'antigénémie peut réapparaître plus tard au cours de la progression de la maladie¹².

Le test Genscreen™ HIV-1 Antigen - EIA est destiné à être utilisé comme une aide au diagnostic et au pronostic de l'infection par le VIH-1.

2 - PRINCIPE DE LA TROUSSE Genscreen™ HIV-1 ANTIGEN EIA

Le test Genscreen™ HIV-1 Antigen - EIA est un test immunoenzymatique pour la détection in vitro de l'antigène p24 de la capside du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) libre dans des échantillons de sérum, de plasma humains et de surnageant de culture cellulaire. Le test «Genscreen™ HIV-1 Antigen Confirmatory Assay» (code 71121) est un test utilisé en complément du test Genscreen™ HIV-1 Antigen-EIA pour confirmer la présence d'antigène p24 du VIH dans des échantillons dont la réactivité a été répétée.

Le test Genscreen™ HIV-1 Antigen - EIA repose sur l'utilisation d'une phase solide préparée avec des anticorps monoclonaux de souris anti-VIH-1, d'un premier conjugué préparé avec des anticorps biotinylés de mouton anti-p24 et d'un deuxième conjugué préparé avec de l'avidine couplée à la peroxydase de Raifort.

La mise en œuvre du test comprend les étapes réactionnelles suivantes :

1. Les échantillons à étudier ainsi que les sérums de contrôle sont distribués dans leurs puits respectifs dans lesquels le diluant des échantillons a été préalablement ajouté. Si des antigènes VIH-1 sont présents dans l'échantillon testé, ils se lient alors aux anticorps qui tapissent les cupules et y resteront fixés pendant l'étape de lavage qui suit. Le dépôt des échantillons est confirmé par un changement de couleur du diluant d'échantillon, du vert au bleu.
2. Le conjugué 1 est ensuite ajouté dans chaque cupule puis incubé. Ceci permet aux anticorps biotinylés de mouton anti-p24 présents dans le conjugué 1 de se lier aux anticorps-antigènes VIH-1 capturés dans les cupules. Ces complexes antigènes-anticorps demeurent fixés aux puits lors de l'étape de lavage qui suit.
3. Le conjugué 2 est alors distribué puis incubé. L'avidine du conjugué 2 se lie spécifiquement aux complexes anticorps-antigènes VIH-1 liés aux cupules. L'excédent non-lié du conjugué est éliminé par lavage.
4. La révélation de la réaction se fait par ajout puis incubation de la solution de travail TMB. Une coloration bleue ou bleu-vert se développe proportionnellement à la quantité d'antigène VIH-1 présente dans l'échantillon. La réaction colorimétrique est arrêtée par l'adjonction d'acide, qui modifie la coloration du bleu-vert au jaune. La densité optique des échantillons et des contrôles est déterminée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 450/620-700 nm.

3 - COMPOSITION DE LA TROUSSE Genscreen™ HIV-1 ANTIGEN EIA

ETIQUETAGE	NATURE DES RÉACTIFS	PRÉSENTATION 71120
R1	MICROPLAQUE 12 barrettes de 8 cupules sensibilisées avec des anticorps murins monoclonaux anti-p24 du VIH-1 Conservateur : ProClin™ 300, Azide de Sodium (<0.1%)	2 plaques
R2	SOLUTION DE LAVAGE CONCENTRÉE (20x) Tampon TrisNaCl pH 7.4 Conservateur : ProClin™ 300 (0,04%)	1 flacon 235 ml
R3	DILUANT DES ÉCHANTILLONS Conservateur : ProClin™ 300 0,5% Colorant vert témoin de l'addition des échantillons	1 flacon 20 ml
C0	SÉRUM DE CONTRÔLE NÉGATIF (Humain) Sérum humain non réactif pour l'antigène VIH et les anticorps anti-VIH, anti-VHC, anti-HTLV-I et AgHbs Sulfate de gentamicine 0,005% Conservateur : ProClin™ 300 0,5%	1 flacon 10 ml
C1	SÉRUM DE CONTRÔLE POSITIF Antigène VIH-1 purifié et dissocié Conservateur : ProClin™ 300 0,5%	1 flacon 7 ml
R4	CONJUGUÉ 1 CONCENTRÉ (100 x) Anticorps de mouton biotinylé anti-p24 - Sulfate de gentamicine 0,005% Conservateur : ProClin™ 300 0,5% Colorant jaune	1 flacon 1 ml
R5	CONJUGUÉ 2 CONCENTRÉ (100 x) Avidine couplée à la peroxydase de Raifort, Sulfate de gentamicine 0,005% Conservateur : ProClin™ 300 0,5% Colorant vert	1 flacon 1 ml
R6	DILUANT DES CONJUGUÉS Tampon avec stabilisants de protéines Conservateur : ProClin™ 300 0,5%	1 flacon 100 ml
R8	TAMPON SUBSTRAT Solution d'acide citrique et d'acétate de sodium pH 4.0 contenant 0.015% d'eau oxygénée et 4% de diméthylsulfoxyde (DMSO)	1 flacon 60 ml
R9	CHROMOGÈNE Solution contenant de la tétraméthylbenzidine (TMB)	1 flacon 5 ml
R10	SOLUTION D'ARRÊT Solution d'acide sulfurique 1N	2 flacons 2 x 28 ml
	Films adhésifs pour microplaques	25 films

4 - MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Eau distillée.
- Eau de Javel (hypochlorite de sodium de 5 à 8 %) qui peut être diluée à une concentration minimum de 10 % de javel (ou hypochlorite de sodium à 0,5 %). Autres désinfectants possibles : éthanol à 70 % ou Wescodyne™ à 0,5 % (West Chemical Products, Inc.).
- Pipettes de précision pour distribuer des volumes de 10 à 200 µl, 1 ml, 5 ml et 10 ml (précision ± 10 %). Pipetteur multicanaux pour distribuer 100 µl ou 200 µl : facultatif.
- Epruvettes graduées 25 ml; 100 ml; 1000 ml.
- Conteneur de déchets contaminés.
- Bain-marie ou incubateur de microplaques thermostaté à 37°C ± 1°C (ou 40 ± 1°C) (*).

- Dispositif de lavage manuel, semi-automatique ou appareil de lavage pour plaque de microtitration (*).
 - Appareil de lecture pour microplaques équipé de filtres 450nm et 620-700nm (*).
 - Barrettes non sensibilisées lorsque des plaques incomplètes sont testées sur automates.
 - Récipients pour réactifs EIA (facultatif).
 - Gants à usage unique.
 - Papier absorbant.
 - Récipients propres en plastique (polystyrène ou polypropylène) pour la préparation des solutions de travail conjugués et de la solution TMB.
 - Milieu de culture cellulaire, par exemple RPMI-1640 contenant 10 % de sérum de veau foetal, équivalent à celui utilisé pour la culture de cellules infectées (en cas de test effectué sur échantillons de cellules).
- (*) Nous consulter pour une information précise concernant les appareils validés par nos services techniques.

5 - CONSIGNES D'HYGIÈNE ET DE SÉCURITÉ

Tous les réactifs de la trousse sont destinés à l'usage du diagnostic «in vitro».

- Porter des gants à usage unique lors de la manipulation des réactifs et des échantillons et se laver les mains soigneusement après leur manipulation.
- Ne pas pipeter à la bouche.
- Le matériel d'origine humaine utilisé dans la préparation du contrôle négatif, a été testé et trouvé négatif en antigène VIH1, en anticorps anti-VIH1 et VIH2, en antigène HB, en anticorps anti-VHC ainsi qu'en anticorps anti HTLV1/HTLV 2
- Le contrôle positif a été inactivé par la chaleur en présence d'un agent dissociant
- Du fait qu'aucune méthode ne peut garantir de façon absolue l'absence de virus VIH, Hépatites B ou C ou d'autres agents infectieux, considérer ces réactifs, ainsi que les échantillons de patients, comme potentiellement infectieux et les manipuler avec les précautions d'usage.
- Considérer le matériel directement en contact avec les échantillons et les réactifs, ainsi que les solutions de lavage, comme des produits contaminés.
- Eviter les éclaboussures d'échantillons ou de solutions les contenant.
- Les surfaces souillées seront nettoyées par de l'eau de javel diluée à 10%. Si le liquide contaminant est un acide, les surfaces souillées seront neutralisées au préalable avec du bicarbonate de soude, puis nettoyées à l'aide d'eau de javel et séchées avec du papier absorbant. Le matériel utilisé pour le nettoyage devra être jeté dans un conteneur spécial pour déchets contaminés.
- Les échantillons, les réactifs d'origine humaine ainsi que le matériel et les produits contaminés seront éliminés après décontamination :
 - soit par trempage dans de l'eau de javel à la concentration finale de 5% d'hypochlorite de sodium (1 volume d'eau de javel pour 10 volumes de liquide contaminé ou d'eau) pendant 30 minutes.
 - soit par autoclavage à 121°C pendant 2 heures minimum.

ATTENTION : NE PAS INTRODUIRE DANS L'AUTOCLAVE DE SOLUTIONS CONTENANT DE L'HYPPOCHLORITE DE SODIUM.

- La fiche de données de sécurité est disponible sur demande.
- Eviter tout contact du tampon substrat, du chromogène et de la solution d'arrêt avec la peau et les muqueuses (risques de toxicité, d'irritation et de brûlures).
- Ne pas omettre de neutraliser et/ou d'autoclaver les solutions ou effluents de lavage ou tout liquide contenant des échantillons biologiques avant de les jeter dans l'évier.
- D'autre part, la manipulation et l'élimination des produits chimiques doivent être effectuées selon les bonnes pratiques de laboratoire.
- Certains réactifs contiennent de l'azoture de sodium comme conservateur. L'azoture de sodium peut former des azotures de plomb ou de cuivre dans les canalisations du laboratoire. Ces azotures sont explosifs. Pour éviter toute accumulation d'azotures, rincer à grande eau les canalisations si les solutions contenant de l'azoture sont éliminées par l'évier après leur inactivation.
- Certains réactifs contiennent du ProClin™ 300 (0.04%, 0.1 % et/ou 0,5%)



Xi Irritant

R43 : peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau

S28-37 : Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et du savon. Porter des gants appropriés.

6 - PRÉCAUTIONS

La qualité des résultats est dépendante du respect des bonnes pratiques de laboratoires suivantes :

- Le nom du test ainsi qu'un numéro d'identification spécifique du test sont mentionnés sur le cadre de chaque microplaque. Ce numéro d'identification spécifique figure également sur chaque barrette.

Genscreen™ HIV-1 Ag EIA : Numéro spécifique d'identification = 49

Cette identification doit être vérifiée avant chaque utilisation. Toute barrette dont le numéro de test est absent ou différent de celui correspondant au test réalisé, ne doit pas être utilisée.

- Ne pas utiliser de réactifs après la date d'expiration.
- Ne pas modifier le mode opératoire.
- Reconstituer soigneusement les réactifs en évitant toute contamination.
- Ne pas mélanger des réactifs de lots différents au cours d'un même essai.

REMARQUE : Il est possible d'utiliser d'autres lots de solution de lavage (R2, identifié 20 x en vert sur l'étiquette), de tampon substrat (R8, identifié TMB buf. en bleu), de chromogène (R9, identifié TMB 11 x en violet) et de solution d'arrêt (R10, identifié 1N en rouge), que ceux fournis dans la trousse sous réserve d'utiliser un seul et même lot de ceux-ci au cours d'un même essai. Ces réactifs peuvent être utilisés avec d'autres produits de notre société. De plus, la solution de lavage (R2, **identifié 20 x en vert** sur l'étiquette), peut être mélangée avec l'une des deux autres solutions de lavage incluses dans les différents kits réactifs Bio-Rad (R2, identifié 10 x en bleu ou 10 x en orange sur l'étiquette) correctement reconstituées, à condition qu'un seul mélange soit utilisé pour une même manipulation donnée. Contacter nos services techniques pour obtenir des informations détaillées.

- Avant utilisation, attendre 30 minutes pour que les réactifs s'équilibrent à la température du laboratoire (18-30°C).
- Ne pas réaliser le test en présence de vapeurs réactives (acides, alcalines, aldéhydes) ou de poussières qui pourraient altérer l'activité enzymatique des conjugués.
- Utiliser une verrerie parfaitement lavée et rincée à l'eau distillée ou de préférence du matériel à usage unique.
- Ne pas laisser la microplaque sécher entre la fin du lavage et le début de la distribution des réactifs.
- Vérifier l'exactitude et la précision des pipettes et le bon fonctionnement des appareils utilisés.
- Lavage: il est indispensable de respecter scrupuleusement les procédures de lavage afin d'obtenir les performances maximales du test.
- Ne jamais utiliser le même récipient pour distribuer le conjugué et la solution de révélation.
- La réaction enzymatique est très sensible à tous métaux ou ions métalliques. En conséquence, aucun élément métallique ne doit entrer en contact avec les différentes solutions contenant les conjugués ou le substrat.
- La solution de révélation (tampon substrat + chromogène) doit être colorée en rose. L'apparition d'une autre coloration dans les minutes suivant la reconstitution indique que le réactif est inutilisable et doit être remplacé. Pour cette préparation, utiliser de préférence des récipients et du matériel de distribution en plastique à usage unique ou de la verrerie préalablement lavée à l'acide chlorhydrique 1N, rincée à l'eau distillée et séchée. Conserver cette solution à l'abri de la lumière.

7 - ÉCHANTILLONS

Prélever un échantillon de sang selon les pratiques en usage.

Les échantillons pouvant être utilisés sont: du sérum, du plasma ou des échantillons de culture cellulaire. Les anticoagulants EDTA, héparine, citrate de sodium, CPDA-1 et ACD ont été évalués et sont considérés comme utilisables. Les échantillons prélevés à l'aide de tubes anticoagulants doivent remplir le tube jusqu'au niveau indiqué afin d'éviter une mauvaise dilution.

Extraire le sérum ou le plasma du caillot ou des globules rouges dès que possible pour éviter toute hémolyse. Une hémolyse très prononcée peut affecter les performances du test. Les échantillons présentant des agrégats doivent être clarifiés par centrifugation avant le test. Les particules ou agrégats de fibrine en suspension peuvent donner des résultats faussement positifs.

Les échantillons de culture de cellules nécessitant une dilution avant utilisation peuvent être dilués avec du milieu de culture cellulaire équivalent au milieu utilisé pour la culture.

NE PAS UTILISER D'ÉCHANTILLONS INACTIVÉS PAR LA CHALEUR.

Les échantillons seront conservés à + 2-8°C si le dépistage est effectué dans les 7 jours ou peuvent être conservés congelés à -20°C. Les plasmas devront subir une décongelation rapide par chauffage pendant quelques minutes à 40°C (pour limiter la précipitation de la fibrine).

En raison de l'instabilité de l'Ag VIH à la chaleur, des températures supérieures à 40°C ne pourront pas être utilisées.

Les échantillons ayant été congelés et décongelés plus de 3 fois ne doivent pas être utilisés.

Si les échantillons doivent voyager, les emballer selon la réglementation en usage pour le transport des agents étiologiques.

Extraire le sérum ou le plasma du caillot ou des globules rouges dès que possible pour éviter toute hémolyse.

NE PAS UTILISER DE SÉRUMS OU PLASMAS CONTAMINÉS, HYPERLIPÉMIQUES OU HYPERHÉMOLYSES.

REMARQUE : Aucune interférence n'a été mise en évidence sur des échantillons contenant 80 mg/l de bilirubine, 36 mg/l d'immunoglobuline M ou G ainsi que sur des échantillons lipidiques contenant jusqu'à 5 g/l de lipides et sur des échantillons hémolysés contenant jusqu'à 5 g/l d'hémoglobine.

8 - RECONSTITUTION DES RÉACTIFS

Tous les réactifs doivent être à température ambiante (18 à 30°C) avant utilisation, exception faite des conjugués concentrés 1 et 2 (R4 et R5).

1) Réactifs prêts à l'emploi

Réactif R1 : Microplaque

Chaque support cadre contenant 12 barrettes est conditionné en sachet "ZIP". Couper le sachet à l'aide de ciseaux ou scalpel 0,5 à 1 cm au-dessus du ZIP. Ouvrir le sachet et sortir le cadre. Replacer dans le sachet les barrettes inutilisées. Refermer le sachet soigneusement et le replacer à +2-8°C.

Réactif R3 : Diluant pour échantillons

Réactif C0 : Sérum de contrôle négatif

Réactif C1 : Sérum de contrôle positif

Réactif R10 : Solution d'arrêt

2) Réactifs à reconstituer

Solution de lavage concentrée 20 fois : R2

Diluer 20 fois la solution dans l'eau distillée. On obtient ainsi la solution de lavage prête à l'emploi. Prévoir 800 ml pour une plaque de 12 barrettes.

REMARQUE : La solution de lavage Genscreen™ EIA (30X), qui fait partie d'autres kits Genscreen™, peut également être utilisée pour ce test. Dans ce cas, diluer un volume de solution de lavage concentrée dans 29 volumes d'eau.

Solution de travail conjugué 1 (R4 + R6) et Solution de travail conjugué 2 (R5 + R6)

Les conjugués 1 (R4) et 2 (R5) sont des solutions concentrées (100 X). Préparer séparément la solution de travail conjugué 1 et la solution de travail conjugué 2 en diluant chacune au 1:101ème dans le diluant de conjugué (R6). Effectuer la préparation dans des récipients propres en plastique. Inscrire sur le récipient le numéro de lot, la date et l'heure de préparation et la date des conjugués concentrés (1 ou 2) ainsi que l'heure limite d'utilisation (24 heures après préparation). Mélanger doucement les solutions de travail avant utilisation. **Après avoir été mélangées, la solution de travail conjugué 1 est jaune et la solution de travail conjugué 2 est verte.**

Préparation de la solution de travail conjugué 1 ou 2 par barrette

Nombre de barrettes nécessaires	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12*	24**
Quantité de conjugué concentré (µl)	20	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	240
Quantité de diluant du conjugué (ml)	2	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	24

*une plaque entière **deux plaques entières

Solution de révélation enzymatique (R8 + R9)

Diluer le R9 dans le R8 au 1/11ème (exemple : 1 ml de réactif R9 dans 10 ml de réactif R8) sachant que 10 ml sont nécessaires et suffisants pour traiter 12 barrettes. Homogénéiser.

9 - VALIDITÉ - CONSERVATION

La trousse doit être gardée à +2-8°C.

Chaque élément de la trousse Genscreen™ HIV-1 Antigen EIA conservé à +2-8°C peut être utilisé après une première ouverture jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret, sauf indication spécifique :

R1 : Après ouverture du sachet, les barrettes conservées à +2-8°C dans leur sachet d'origine, refermé avec soin, sont utilisables pendant 1 mois.

R2 : La solution de lavage diluée peut être conservée à +2- 30°C pendant 2 semaines. La solution de lavage concentrée (R2) peut être conservée à +2- 30°C.

R8 + R9 : Après reconstitution les réactifs conservés à l'obscurité sont utilisables 6 heures à température ambiante (18-30°C).

R4 - R5 : Après reconstitution, les conjugués sont utilisables 24 heures à température ambiante (18-30°C).

10 - MODE OPÉRATOIRE

Deux procédures pour la détection de l'antigène p24 du VIH-1 dans le sérum ou le plasma humains ou dans des échantillons de culture cellulaire sont présentées ci-dessous :

Procédure	Incubation	Conjugué 1 incubation	Conjugué 2 incubation	Révélation colorimétrique
Incubation 37°C	Incubation statique 37±1°C, chaleur sèche 60 ± 5 min.	Incubation statique 37±1°C, chaleur sèche 30 ± 5 min.	Incubation statique 37±1°C, chaleur sèche 30 ± 5 min.	Incubation statique 18 à 30°C, dans l'obscurité 30 ± 5 min.
Incubation 40°C	Incubation statique 40 ± 1°C, chaleur sèche 60 ± 5 min.	Incubation statique 40 ± 1°C, chaleur sèche 30 ± 5 min.	Incubation statique 40 ± 1°C, chaleur sèche 30 ± 5 min.	Incubation statique 18 à 30°C, dans l'obscurité 30 ± 5 min.

Pour les échantillons testés à l'origine à 37 ou 40°C, tout nouveau test ou toute confirmation devra être effectué selon la même procédure.

La durée indicative de ce test est d'environ 3 h 30 à 4 heures à partir du début de la première étape d'incubation. Chaque cycle de la procédure d'utilisation du test doit être effectué intégralement et sans interruption une fois commencé.

Deux contrôles positifs et trois contrôles négatifs doivent être réalisés sur chaque plaque. En cas de test effectué sur échantillons de cellules, trois contrôles négatifs de milieu de culture cellulaire sont nécessaires au lieu du contrôle négatif de la trousse (C0). Le seuil de réactivité pour les échantillons de patients est déterminé en fonction des signaux obtenus avec les contrôles sur chaque plaque individuelle.

Éviter que les plaques ne soient exposées à la lumière au cours de la dernière étape d'incubation (après adjonction de la solution de travail TMB).

Suivre strictement le protocole proposé et appliquer les bonnes pratiques de laboratoire :

1. Établir soigneusement le plan de distribution et d'identification des échantillons
2. Préparer la solution de lavage diluée,
3. Sortir le cadre support et les barrettes (R1) de l'emballage protecteur
4. Déposer directement, sans prélavage de la plaque, successivement (suggestion de plan de distribution de la plaque) :
 - 4.1 50 µl de diluant d'échantillon dans chaque cupule
 - 4.2 150 µl de contrôle négatif (C0) en A1- B1- C1
 - 4.3 150 µl de contrôle positif (C1) en D1-E1
 - 4.4 150 µl d'échantillon en G1, etc...

En fonction du système utilisé, il est possible de modifier la position ou l'ordre de distribution des contrôles.

En cas de test effectué sur échantillons de cellules, trois contrôles négatifs de milieu de culture cellulaire sont nécessaires au lieu du contrôle négatif de la trousse (C0). S'assurer que le diluant d'échantillon est bien mélangé à l'échantillon (ou au contrôle).

NB : la distribution des échantillons et du diluant échantillons peut être contrôlée visuellement à ce stade de la manipulation : Le diluant d'échantillon passe du vert au bleu pour signaler que l'échantillon ou le contrôle a bien été ajouté dans le puits. Lorsque les solutions contenues dans chaque puits sont bien mélangées, elles ont une couleur uniforme.

Les échantillons de culture cellulaire peuvent ne pas changer de couleur en fonction du milieu de culture utilisé.

(se référer au chapitre 12 pour la vérification automatique - VÉRIFICATION SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DU DÉPÔT DES ÉCHANTILLONS).

5. Lorsque cela est possible, couvrir d'un film autocollant en appuyant bien sur toute la surface pour assurer l'étanchéité.
 6. Incuber la plaque pendant 60±5 minutes à 37 ± 1°C ou à 40 ± 1°C avec un incubateur statique à chaleur sèche.
 7. Retirer le film adhésif. Aspirer le contenu de toutes les cupules dans un conteneur pour déchets contaminés (contenant de l'hypochlorite de sodium) et ajouter immédiatement dans chacune d'elles un minimum de 0,370 ml de solution de lavage. Respecter un temps de trempage (temps d'attente) de 20 à 60 secondes. Aspirer de nouveau. Répéter le lavage 4 fois (un minimum de 5 lavages). Le volume résiduel doit être inférieur à 10 µl (si nécessaire sécher la plaque par retournement sur une feuille de papier absorbant).
- Si l'on dispose d'un laveur automatique, respecter le même cycle opératoire

8. Distribuer rapidement 100 µl de la solution de travail conjugué 1 dans toutes les cupules. Le conjugué doit être agité avant emploi.
N.B. : La distribution de la solution de travail du conjugué 1 qui est coloré en jaune peut être vérifiée visuellement à ce stade de la manipulation.
9. Si cela est possible, recouvrir la microplaque d'un film neuf. Incuber 30 ± 5 minutes à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ou à $40 \pm 1^\circ\text{C}$ dans un incubateur statique à chaleur sèche.
10. Retirer le film adhésif. Aspirer le contenu de toutes les cupules dans un conteneur pour déchets contaminés (contenant de l'hypochlorite de sodium) et ajouter immédiatement dans chacune d'elles un minimum de 0,370 ml de solution de lavage. Respecter un temps de trempage (temps d'attente) de 20 à 60 secondes. Aspirer de nouveau. Répéter le lavage 4 fois (un minimum de 5 lavages). Le volume résiduel doit être inférieur à 10 µl (si nécessaire sécher la plaque par retournement sur une feuille de papier absorbant).
11. Distribuer rapidement 100 µl de la solution de travail conjugué 2 dans toutes les cupules. Le conjugué doit être agité avant emploi.
N.B. La distribution de la solution de travail du conjugué 2 qui est coloré en vert peut être vérifiée visuellement à ce stade de la manipulation
12. Si cela est possible, recouvrir la microplaque d'un film neuf. Incuber 30 ± 5 minutes à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ou à $40 \pm 1^\circ\text{C}$ dans un incubateur statique à chaleur sèche.
13. Retirer le film adhésif, vider toutes les cupules par aspiration et laver au moins 5 fois comme précédemment. Le volume résiduel doit être inférieur à 10 µl (si nécessaire, sécher les barrettes par retournement sur une feuille de papier absorbant).
14. Distribuer rapidement dans toutes les cupules 100 µl de la solution de révélation de l'activité enzymatique (R8 + R9) préalablement préparée. Laisser la réaction se développer à l'obscurité pendant 30 ± 5 minutes à température ambiante (18 à 30°C). Lors de cette incubation, ne pas utiliser de film adhésif.
N.B.: La distribution de la solution de révélation, qui est colorée en rose, peut être contrôlée visuellement à ce stade de manipulation : Il y a une différence de coloration significative entre une cupule vide et une cupule contenant la solution de révélation rosée. (se reporter au paragraphe 12 pour la vérification automatique VÉRIFICATION SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DU DÉPÔT DES ÉCHANTILLONS ET DES RÉACTIFS)
15. Ajouter 100 µl de la solution d'arrêt (R10) en adoptant la même séquence et le même rythme de distribution que pour la solution de révélation. Homogénéiser le mélange réactionnel.
N.B.: La distribution de la solution d'arrêt, qui est incolore, peut être contrôlée visuellement à ce stade de la manipulation. La coloration du substrat, rosée (pour les échantillons négatifs) ou bleu (pour les échantillons positifs), disparaît des cupules qui deviennent incolores (pour les échantillons négatifs) ou jaunes (pour les échantillons positifs) après addition de la solution d'arrêt.
16. Essuyer soigneusement le dessous des plaques. **Au moins 4 minutes après la distribution de la solution d'arrêt** et dans les 30 minutes qui suivent l'arrêt de la réaction, lire la densité optique à 450/620-700 nm à l'aide d'un lecteur de plaques.
17. S'assurer avant la transcription des résultats de la concordance entre la lecture et le plan de distribution et d'identification des plaques et des échantillons.

11 - CALCUL ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

1) Validation de l'essai

Un test est valide si les critères suivants sont remplis :

- Les valeurs d'absorbance individuelles des contrôles négatifs (ou des contrôles de milieu de cultures de cellules, le cas échéant) doivent être supérieures à 0,000 UA et inférieures ou égales à 0,100 UA. Une des valeurs d'absorbance d'une cupule du contrôle négatif peut être éliminée si elle est située en dehors de ces normes. La moyenne des contrôles négatifs peut dans ce cas être calculée à partir des deux valeurs d'absorbance restantes. Si deux contrôles négatifs ou plus ne respectent pas ces critères, le dosage doit être de nouveau effectué.
- Les absorbances moyennes des contrôles positifs doivent être supérieures ou égales à 0,500 UA et la valeur d'absorbance de chaque contrôle positif doit être située dans le domaine de reproductibilité de 0,65 à 1,35 fois la moyenne des contrôles positifs. Toutes les valeurs d'absorbance des contrôles positifs doivent être prises en compte.

2) Calcul de la moyenne des absorbances

A partir des contrôles validés, déterminer les absorbances moyennes des contrôles négatifs et positifs en divisant la somme de leurs valeurs d'absorbance par le nombre de contrôles utilisés.

3) Calcul de la valeur seuil

La valeur seuil est calculée par la somme d'un facteur constant (0,070) avec la valeur d'absorbance moyenne des contrôles négatifs (CNX).

Valeur seuil = 0,070 + CNX

Exemple :

CNX = 0.033

Valeur Seuil = 0,070 + 0,033 = 0,103

4) Interprétation des résultats

La présence ou l'absence des antigènes VIH1 est déterminée en comparant pour chaque échantillon l'absorbance enregistrée à celle de la valeur seuil calculée.

Les échantillons dont les valeurs d'absorbance sont inférieures à 0,000 doivent être de nouveau testés. Les échantillons dont les valeurs d'absorbance sont supérieures aux limites de linéarité du lecteur sont considérés réactifs.

Les échantillons dont les valeurs d'absorbance sont inférieures à la valeur seuil sont considérés non réactifs au test EIA antigène VIH-1 Genscreen™ et peuvent être considérés comme négatifs pour l'antigène VIH-1. Dans ce cas, il n'est pas nécessaire d'effectuer un autre test.

Les échantillons dont les valeurs d'absorbance sont supérieures ou égales à la valeur seuil sont considérés comme initialement réactifs au test EIA Genscreen™ antigène VIH-1. Les échantillons initialement réactifs doivent être de nouveau testés deux fois afin de valider les résultats du test initial. Si à la suite de ces nouveaux tests les deux nouvelles valeurs d'absorbance obtenues sont inférieures à la valeur seuil, le résultat initial est non reproductible et l'échantillon d'origine est déclaré négatif pour l'antigène VIH-1 selon le test "Genscreen™ HIV-1 Antigen". L'origine des réactions non reproductibles est souvent en relation avec les causes suivantes :

- lavage insuffisant des microplaques,
- contamination croisée d'échantillons non réactifs par un échantillon fortement titré en antigène VIH-1.
- contamination ponctuelle de la solution de révélation par des agents chimiques oxydants (eau de javel, ions métalliques, etc...).
- contamination ponctuelle de la solution d'arrêt.

Si après la répétition de l'essai, la valeur d'absorbance mesurée sur l'un des deux doublets est supérieure ou égale à la valeur seuil, le résultat initial est reproductible et l'échantillon est déclaré réactif selon le test Genscreen™ HIV-1 Antigen, conformément aux limites décrites ci-après. Les échantillons dont la réactivité a été répétée avec le test Genscreen™ HIV-1 Antigen - EIA doivent être confirmés avec le test Genscreen™ HIV-1 Antigen Confirmatory Assay (code : 71121). L'échantillon peut être considéré positif pour l'antigène VIH-1 seulement si l'antigène VIH-1 est neutralisé lors de la procédure de confirmation.

12 - VÉRIFICATION SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DU DÉPÔT DES ÉCHANTILLONS ET DES RÉACTIFS

Vérification spectrophotométrique du dépôt des échantillons

Après la distribution successive du diluant des échantillons (R3) puis des échantillons, il est possible de vérifier la présence des échantillons à tester dans les cupules par une lecture spectrophotométrique à 620 nm : la densité optique d'une cupule contenant un échantillon devra être supérieure à 0,250 (une DO inférieure indique une mauvaise distribution de celui-ci).

REMARQUE : les échantillons de culture cellulaire peuvent ne pas changer de couleur en fonction du milieu de culture utilisé. Dans ce cas ne pas appliquer cette vérification automatique.

Vérification spectrophotométrique du dépôt de la solution de révélation

Il est possible de vérifier la présence de la solution de révélation rosée par lecture automatique à 490 nm : une cupule contenant la solution de révélation doit avoir une densité optique supérieure à 0.100 (une DO plus faible indique une mauvaise distribution de la solution de révélation).

Il y a une différence de coloration significative entre une cupule vide et une cupule contenant la solution de révélation rosée.

13 - PERFORMANCES

Sensibilité diagnostique

- 138 échantillons de patients infectés par le VIH à différents stades de l'infection (AIDS, ARC, autres) ont été testés et trouvés positifs avec le test Genscreen™ HIV-1 Antigen EIA.
- 20 panels de séroconversion bien documentés ont été étudiés. Les résultats obtenus sont comparables aux résultats obtenus avec d'autres tests de dosage de l'antigène HIV.
- 55 surnageants de cultures cellulaires de VIH1 (dont 53 de groupe M et 2 de groupe O) ainsi que le panel de dilution "Ag VIH SFTS 96" ont tous été trouvés positifs avec le test Genscreen™ HIV-1 Antigen EIA à l'exception de 2 dilutions d'un surnageant de culture cellulaire de groupe O.

- Les 53 surnageants de cultures cellulaires de VIH1 de groupe M sont composés des génotypes suivants : 10 de génotype A, 10 de B, 9 de C, 5 de D, 11 de E, 2 de F, 2 de G, 1 de H, 2 de J et 1 de N.
- Le panel de dilution "Ag VIH SFTS 96" comprend les génotypes suivants : A, B, C, D, E, F, G, H du groupe M et 1 génotype de groupe O.

Sensibilité analytique

Le seuil de sensibilité du test a été étudié sur une gamme de dilutions préparées à partir de l'étalon national français (lysate viral purifié de génotype B dilué en plasma citraté négatif) ainsi que sur le panel BBI (PRA 801). Lors de ces essais, le seuil de détection a été estimé à 8 pg/ml d'antigène HIV, quelque soit le protocole utilisé.

La gamme d'étalonnage obtenue avec le standard "HIV-1 Ag Standard" (code 72217) de Bio-Rad est linéaire de 0 à 100 pg/ml.

Spécificité diagnostique

La spécificité du test déterminée à partir :

- d'une population de 4038 donneurs de sang est estimée à 99,95%.
- d'une population de 209 patients hospitalisés est estimée à 100%.

Un panel de 105 échantillons de patients a été testé. Il comprend des échantillons :

- contenant des anticorps dirigés contre HAV, HCV, HTLV, HSV, EBV, Rubella, *Toxoplasma Gondii*, *Treponema pallidum*, CMV
- contenant des autoanticorps, des taux d'IgG, d'IgM de facteur rhumatoïde élevés provenant de femmes enceintes, de cirrhotiques, de polytransfusés ainsi que de patients atteints de Lupus Erythémateux Systématique.

Un seul échantillon provenant d'un patient atteint de Lupus Erythémateux a été trouvé réactif avec le test Genscreen™ HIV-1 Antigen EIA mais n'a pas été confirmé positif avec le test de confirmation.

Précision

La répétabilité intra-essai a été étudiée en testant 3 échantillons positifs et 1 négatif 30 fois chacun lors du même essai.

La reproductibilité inter-essai a été étudiée en testant 3 échantillons positifs et un négatif en triplicate pendant 5 jours par deux techniciens différents.

Les coefficients de variation obtenus sur les échantillons positifs testés sont inférieurs à 10%.

14 - LIMITES DU TEST

- La procédure du test Genscreen™ HIV-1 Antigen - EIA et le mode d'interprétation des résultats doivent être utilisés pour la recherche de l'antigène VIH-1 dans des échantillons de sérum, de plasma ou de cultures cellulaires. Il est recommandé aux utilisateurs de ce kit de lire la présente notice d'utilisation avec attention avant réalisation du test. Les procédures du test doivent tout particulièrement être respectées en ce qui concerne le pipetage des échantillons et des réactifs, le lavage des plaques et la durée des étapes d'incubation.
- Un échantillon ne doit pas être considéré comme réactif pour l'antigène VIH-1 à partir d'un seul résultat réactif. Afin d'établir la spécificité de la réactivité de chaque échantillon selon ce test, il est nécessaire d'effectuer de nouveaux dosages comme par exemple un test de confirmation.
- Tout test immunoenzymatique hautement sensible peut être sujet à des réactions non spécifiques qui peuvent entraîner des résultats faussement positifs. La proportion des échantillons réactifs faussement réactifs dépend de la sensibilité et de la spécificité du kit utilisé.
- Des résultats négatifs peuvent être obtenus pour des échantillons dont le taux en antigène VIH est trop bas comparativement aux limites de détection du test, tout comme des résultats négatifs peuvent être observés si le marqueur recherché n'est pas présent au stade de la maladie auquel l'échantillon a été prélevé.
- La variabilité des virus VIH ne permet pas d'exclure la possibilité de réactions faussement négatives. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance que le virus VIH est absent.
- Si l'addition d'échantillon ou de réactif n'a pas été faite conformément aux instructions, il est possible d'obtenir un résultat faussement négatif. Il faut envisager d'effectuer un nouveau dosage en cas de suspicion clinique d'infection ou d'erreur au cours de la procédure.
- Une valeur d'absorbance inférieure à 0,000 UA signale une erreur au cours de la procédure ou un problème lié au matériel. L'échantillon concerné doit alors être retesté.
- Les facteurs pouvant affecter la validité des résultats sont les suivants : mauvais dépôt de l'échantillon dans le puits, mauvais lavage des puits des microplaques, non respect des temps et températures d'incubation indiqués, erreurs dans les dépôts des réactifs, présence de métaux ou d'eau de javel dans les puits.
- Les performances de ce test n'ont pas été évaluées sur des échantillons post mortem ou sur fluides biologiques autres que le sérum ou le plasma ou échantillons de culture cellulaire.

- La sensibilité analytique, estimée à 8 pg/ml lors des évaluations du test peut varier en fonction des conditions opératoires et de la variabilité interlots. En conséquence, seule une sensibilité analytique inférieure à 15 pg/ml peut être garantie par Bio-Rad.
- La coloration du diluant des échantillons peut ne pas être modifiée en présence d'échantillon de culture cellulaire en fonction du milieu de culture utilisée
- La méthode colorimétrique de vérification du dépôt des échantillons et/ou des conjugués et/ou de la solution de révélation ne permet pas de vérifier l'exactitude des volumes distribués mais seulement de montrer la présence d'échantillons et/ou des conjugués et/ou de la solution de révélation. Le taux de réponses erronées obtenues avec cette méthode est liée à la précision du système utilisé (des CV cumulés de pipetage et de lecture supérieurs à 10% peuvent dégrader significativement la qualité de cette vérification).
- Dans le cas d'un lavage inefficace après l'étape d'incubation du conjugué, la vérification automatique de la distribution de la solution de révélation (par lecture à 490 nm des densités optiques des cupules) peut donner des résultats erronés avec des densités optiques supérieures à 0.100 en l'absence de solution de révélation. Cependant, ce phénomène n'a pas été observé durant les évaluations conduites sur 939 échantillons testés.

15 - RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al: Isolation of T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome(AIDS). *Science* 220:868-871,1983.
2. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, et al: Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224:500-503,1984.
3. Coffin J, Haase A, Levy JA, et al: What to call the AIDS virus? *Nature* 321:10, 1986.
4. Van der Graff M, Diepersloot R: Transmission of human immunodeficiency virus (HIV/ HTLV-III/ LAV): a review, *Infection* 14:203-211,1986.
5. Weis R: Retrovirus and human disease. *J Clin Pathol* 40:1064-69,1987.
6. Tovo P, Gabiano C, Riva C, et al: Specific antibody and virus antigen expression in congenital HIV infection, *Lancet* 1:1201,1987.
7. Tegtmeier G: Current tests for serologic detection of HIV-1 infection. *J Clin Immunoassay* 11:123-125,1988.
8. Schumacher R, Garrett P, Tegtmeier G, et al: Comparative detection of anti-HIV in early HIV seroconversion. *J Clin Immunoassay* 11:130-134,1988.
9. Casey JM, Kim Y, Andersen PR, et al: Human T-cell lymphotropic virus type III: immunologic characterization and primary structure analysis of the major internal protein, p24. *J Virology* 55:417-423,1985.
10. Ritter J, Escaich S, Trepo C, et al: HIV antigen detection in antibody negative sera. Abstract 1627, IV International Conference on AIDS, 1988.
11. Veronese FD, Sarngadharan MG, Rahman R, et al: Monoclonal antibodies specific for p24, the major core protein of human T-cell Leukemia virus type III. *Natl Acad Sci USA*, 82:5199-5202,1985.
12. Schaeffler B, Flesher A, Shriver K, Tam MR: Monoclonal antibody detection of p25 HIV antigen in the serum and CSF of patients within the AIDS spectrum. Abstract 7759, IV International Conference on AIDS, 1988.
13. Bos ES, van der Doelen AA, van Rooy N, Schurs AHWM: 3,3',5,5' - Tetramethylbenzidine as an Ames test negative chromogen for horseradish peroxidase in enzyme immunoassay. *J Immunoassay* 2:187-204,1981.
14. Garner RC, Walpole AL, Rose FL: Testing of some benzidine analogues for microsomal activation to bacterial mutagens. *Cancer Letters* 1:39-42,1975.
15. Resnick L, Veren K, Salahuddin SZ, et al: Stability and inactivation of HTLV-III/LAV under clinical laboratory environments. *JAMA* 255:1887-1891,1986.
16. Sarngadharan MG, Markham PD: The role of human T-lymphotropic retroviruses in leukemia and AIDS, in Wormser GP (ed.): *AIDS and Other Manifestations of HIV Infection*. New Jersey, Noyes Publications 1987, pp 218- 220.
17. Bond WW, Favero MS, Petersen NJ, et al: Inactivation of Hepatitis B virus by intermediate-to-high level disinfectant chemicals. *J Clin Micro* 18:535-538,1983.



- CE marking (European directive 98/79/CE on *in vitro* diagnostic medical devices)
- Marquage CE (Directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*)
- Marcado CE (Directiva europea 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico *in vitro*)
- EG Markierung (Europäische Richtlinie 98/79/EG über *In vitro*-Diagnostika)
- Marchiatura CE (Direttiva europea 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici *in vitro*)
- Marcação CE (Directiva europeia 98/79/CE relativa aos dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro*)
- CE-märkning (Europa direktiv 98/79/EG om medicintekniska produkter för *in vitro*-diagnostik)
- CE-mærkningen (Europa direktiv 98/79/EF om medicinsk udstyr til *in vitro*-diagnostik)

IVD

- For *in vitro* diagnostic use
- Pour diagnostic *in vitro*
- Para diagnóstico *in vitro*
- *In vitro*-Diagnostikum
- Per uso diagnostico *in vitro*
- Para uso em diagnóstico *in vitro*
- *In vitro* diagnostik
- *In vitro* diagnose



- Manufacturer
- Fabricant
- Fabricante
- Hersteller
- Produttore
- Fabricante
- Tillverkad av
- Fremstillet af

LOT

- Batch code
- Code du lot
- Código de lote
- Chargen-Bezeichnung
- Codice del lotto
- Código do lote
- Batch nr.
- Batchkoden



- Storage temperature limitation
- Limites de températures de stockage
- Temperatura limite
- Lagerungstemperatur
- Limiti di temperatura di conservazione
- Limites de temperatura de armazenamento
- Temperaturbegrensning
- Temperaturbegrænsning

REF

- Catalogue number
- Référence catalogue
- Número de catálogo
- Bestellnummer
- Numero di catalogo
- Número de catálogo
- Katalognummer
- Katalognummer

EC REP

- Authorised Representative
- Représentant agréé
- Representante autorizado
- Bevollmächtigter
- Distributore autorizzato
- Representante Autorizado
- Auktoriserad representant
- Autoriseret repræsentant



- Expiry date YYYY/MM/DD
- Date de péremption AAAA/MM/JJ
- Estable hasta AAAA/MM/DD
- Vervendbar bis JJJJ/MM/TT
- Da utilizzare prima del AAAA/MM/GG
- Data de expiração AAAA/MM/DD
- Utløbsdato År/Månad/Dag
- Anvendes før ÅÅÅÅ/MM/DD



- Consult Instruction for use
- Consulter le mode d'emploi
- Consulte la instrucción para el uso
- Siehe Gebrauchsanweisung
- Consultare le istruzioni per uso
- Consulte o folheto informativo
- Se instruktionsanvisning vid användning
- Se instruktion før brug

